GE Healthcare

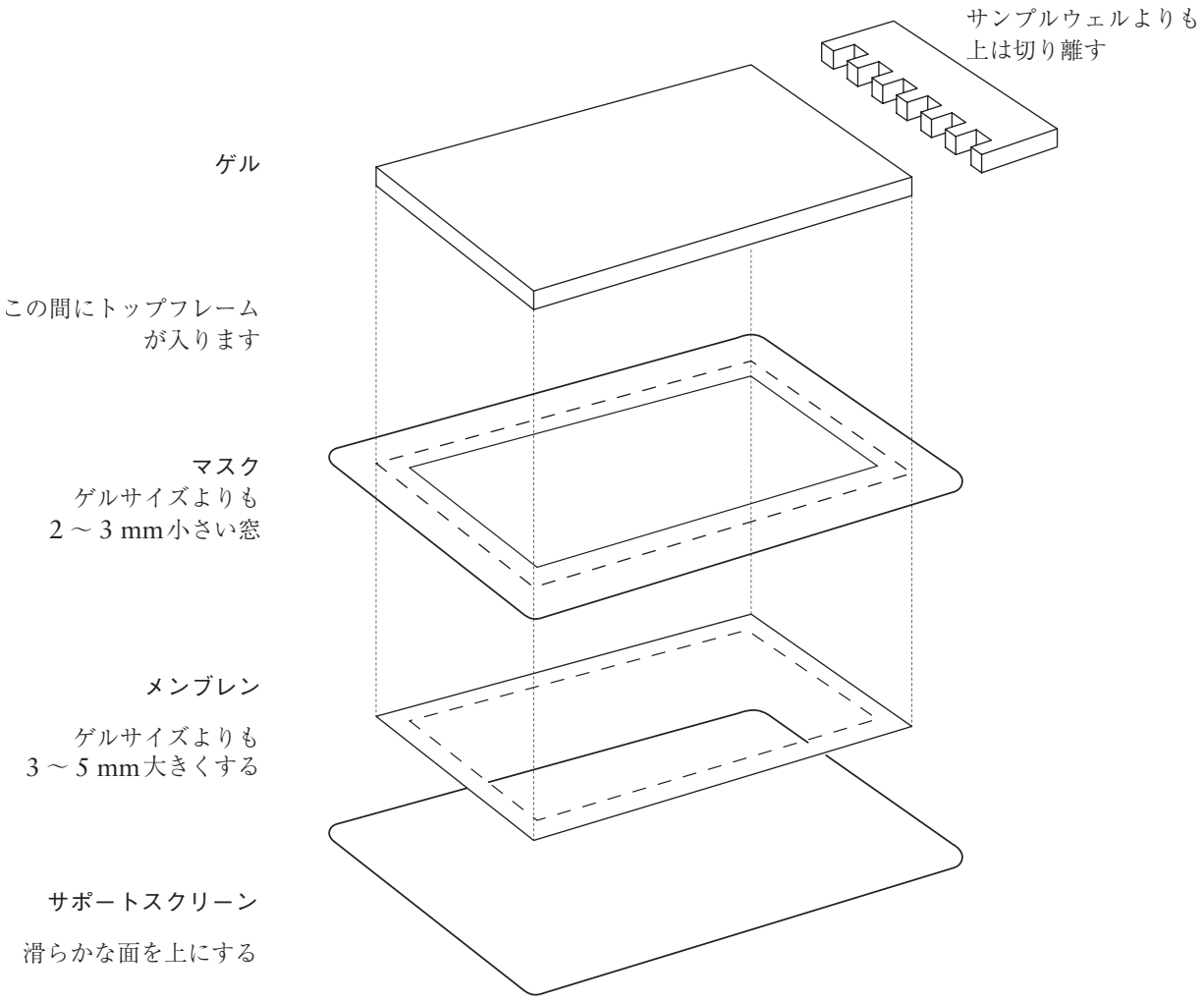
VacuGene XL簡易インストラクションマニュアル（Ver. 1.1）

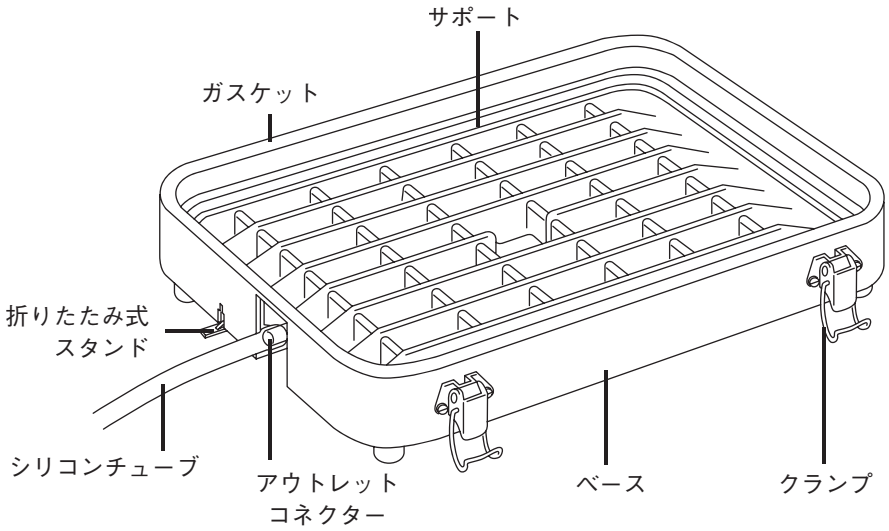
1. 高分子DNAの塩酸脱プリン化とバキュームトランスファー
2. 高分子DNAのUV処理とバキュームトランスファー
3. DNAのアルカリバキュームトランスファー
4. RNAのバキュームトランスファー

GE imagination at work

71-2407-21

VacuGene XL Unitの組立て方





1. 高分子DNAの塩酸脱プリン化とバキュームトランスファー

イントロダクション

GEヘルスケア バイオサイエンスのVacuGene XLは、DNAおよびRNAを低圧真空下で、メンブランにブロッティングするためのシステムです。この手法が紹介された当初から、高分子量（染色体）DNAの転写法の至適化の要望が寄せられました。

以下のプロトコールでは、DNAを脱プリン化して、このタイプの転写を行う方法を記述しています。

アプリケーション

以下に述べたプロトコールは、どのような高分子のDNAおよびアガロースゲルの厚さ、濃度に制限なく応用できます。転写の効率を高めるためには、多孔性のサポートスクリーンをあらかじめ蒸留水に浸します。

操作

1. トラップボトルを間にして、ポンプとブロッティングユニットをチューブで接続します。サポートスクリーンをユニットにセットします。
（滑らかな面を上にします）

2. ゲルのサンプルウェルより上（泳動されてない側）の部分を切り離し、ゲルの大きさを測定します。

3. ゲルのサイズよりも各辺が3～5 mm大きくナイロンメンブランを切り、前処理し、ゲルサイズよりも各辺が2～3 mm小さい窓をプラスチックマスクに開けます。
（ニトロセルロースメンブランはNaOH溶液に弱いのでご注意ください）

4. サポートスクリーン上にメンブランがマスクの窓枠下にくるようにメンブラン、プラスチックマスクの順におきます。トップフレームをのせ、四隅のクランプを締めます。

5. ゲルをマスクの窓全体にオーバーラップするように置く。21×31cm以上のゲルは、切ってのせます。

   a）ゲル端からメンブランの上に載せていき、気泡が入らないように注意します。

   b）ゲルの中の小さな割れは、溶かした低融点アガロースでシールしてください。

6. ポンプのスイッチを入れ真空圧が50-55 mbarになるように設定します。バキューム状態の時、ゲルは常に溶液で覆われていなければならないのでご注意ください。

7. 脱プリン化：Pump始動後すぐに約50 ml（ゲルの大きさによる）の脱プリン化液（0.2 N HCl）をゲル上にピペットで注ぎます。ゲル中のブロモフェノールブルーが黄色になるまで放置（約20分）。ブロモフェノールブルーの変色する時間は、ゲルの厚さ、濃度に応じて増減します。その後、折りたたみ式スタンドを利用してブロッティングユニットを傾け、ゲル上に残っている溶液をグローブ（手袋）した手でゲルを押さえながら除きます。余分な液は、ピペットまたはアスピレーターで取り除いてください。

8. 変性：すぐに50mlの変性液（0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl）をゲル上にピペットで注ぎます。脱プリン化に要した時間と同じ時間放置（約20分）。終了後、変性液は上記の方法で除去します。

9. 中和：50mlの中和液（1 M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl）をピペットでゲル上に注ぎます。脱プリン化に要した時間と同じ時間放置します。終了後、中和液は上記の方法で除去してください。

10. 転写：20 × SSCをゲル厚の2倍の深さになるよう、ブロッティングユニット内に注ぎます（溶液を装置内に入れる）。脱プリン化に要した時間の3倍（約1時間）かけて転写します。この間、ゲルが溶液

中に浸っているようにします。転写後、溶液を上記の方法で除去します。

11. ポンプのスィッチを切りウェルの印をつけます。ゲルを取り除き、メンブランを取り出します。

12. メンブランを20×SSCで10分間洗い、アガロースが残らないようにします。

室温で、30分間乾燥させます。1～2時間加熱するかUV処理して、固定します。

溶液組成

I.	脱プリン化溶液	0.2 N HCl
II.	変性溶液	0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl
III.	中和溶液	1 M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl
IV.	転写溶液	20×SSC NaCl 175.3g 88.2g Na-Citrate in 800ml Adjust pH to 7.0 and volume to 1L

2. 高分子DNAのUV前処理とバキュームトランスファー

イントロダクション

GEヘルスケア バイオサイエンスのVacuGene XLは、DNAおよびRNAをメンブランに転写するために必要な時間を大幅に削減しました。

高分子量DNAの転写時間は、UV照射によっても節約できます。以下の操作では、この転写方法について記述しています。

アプリケーション

以下に述べたプロトコールは、どのような高分子量DNAにも応用できます。ただし、UV光源とゲルの厚さより条件を多少変える必要があります。

操作

1. トラップ用ボトルを間にして、ポンプとブロッティングユニットをチューブで接続します。ブロッテイングユニット内にサポートスクリーンの滑らかな面を上にしておきます。

2. サンプルウェルより上を切りとったゲルサイズよりも、各辺が3～5 mm大きくなるようナイロンメンブランを切り、前処理し、ゲルサイズよりも各辺が2～3 mm小さい窓をプラスチックマスクにあけます(ニトロセルロースメンブランはNaOH溶液に弱いのでご注意ください)。

3. サポートスクリーン上にメンブレンがマスクの窓枠下にくるようにメンブレン、マスクの順にのせます。トップフレームをのせ、四隅をクランプで締めます。

4. 転写の前に、ゲルを302 nmのUV光で10分間照射することにより、DNAにニックを入れます。

注意

UV光の光の強さは、光源の寿命にも依存するので光の強さに応じて時間をのばす。254 nmのUV光は、302 nmの光を用いた時の半分の時間でよい。

5. ゲルをマスクの窓全体にオーバーラップするように置きます。21 × 31cm 以上のゲルは切ってのせます。

   a) ゲルは端からメンブレンの上に載せていき気泡が入らないようにします。ゲルとマスクの窓は少なくとも 2 mm 重なるようにします。

   b) ゲルの中の小さな割れは溶かした低融点アガロースでシールしてください。

6. ポンプのスイッチを入れ真空圧が 50 ～ 55 mbar になるように設定してください。

注意

バキューム状態の時、ゲルは常に溶液で覆われていなければならないのでご注意ください。必要なら、さらに液を加えます。

7. 変性: すぐに約 50 ml の変性液 (0.5 M NaOH, 0.5 M NaCl) をピペットでゲルの上に注ぎます。20 分間放置。折りたたみ式のスタンドを利用して、グローブした手でゲルを押さえながらブロティングユニットを傾けます。ゲルの上に残っている溶液をピペット等で丁寧に除きます。

8. 中和: 50 ml の中和液 (1 M Tris pH 7.5, 1.5 M NaCl) をピペットでゲル上に注ぎます。20 分間放置。中和液は、上記の方法で除去してください。

9. 転写: 20 × SSC をゲル厚の 2 倍の深さになるように注ぎます。(溶液を、ブロッティングユニット内に入れる) 1 時間転写します。この間、ゲルが溶液中に浸っているようにします。転写溶液は上記の方法で除去してください。

注意

ゲルの脇から溶液をそそぐと、メンブレンがもち上がり、ずれる可能性があるのでゲル上に注ぐ。

10. ポンプのスイッチを切り、ウェルの印をつけます。ゲルを持ち上げ除き、メンブランを取り出します。

11. メンブランを 20 × SSC で 10 分間洗いアガロースが残らないようにします。室温で 30 分間乾燥させます。1 ～ 2 時間加熱するか UV 処理して固定します。

溶液組成

I. 変性溶液 0.5 M NaOH, 0.5 M NaCl
II. 中和溶液 1 M Tris pH 7.5, 1.5 M NaCl
III. 転写溶液 20 × SSC

3. DNAのアルカリバキュームトランスファー

イントロダクション

VacuGene XLブロッティングシステムでは、低圧真空下でDNAおよびRNAを転写します。このプロトコールでは、DNAを転写するためのアルカリ処理法について記述します。

アプリケーション

以下のプロトコールは、サブマリン電気泳動で分離したDNAを転写するための方法を述べています。この手法では、変性処理およびベイキングまたはUV架橋は必要ありません。

操作

1. トラップ用ボトルを間にして、ポンプとブロッティングユニットをチューブで接続します。サポートスクリーン(滑らかな面を上にする)をユニットにセットします。

2. サンプルウェルより上を切り離したゲルサイズよりも、各辺が3～5 mm大きくなるようにナイロンメンブレンを切り、前処理し、ゲルサイズより2～3 mm小さな窓をマスクにあけます。

3. サポートスクリーン上にメンブレン、マスクの順におき、メンブレンがマスクの窓枠部にくるようにします。トップフレームをのせ四隅をクランプで締めます。

4. ゲルをマスクの窓全体にオーバーラップするように置きます。21×31 cm以上のゲルは切ってのせます。

   a)ゲル端からメンブレンの上に載せていき、気泡が入らないように注意します。ゲルとマスクの窓枠は少なくとも、2 mm重なるようにします。

   b)ゲルの中の小さな割れは溶かした低融点アガロースでシールしてください。

5. ポンプのスイッチを入れ真空圧が50～55 mbarになるように設定します。

注意

バキューム状態の時、ゲルは常に溶液で覆われていなければならないのでご注意ください。必要なら、さらに液を加えます。

6. 脱プリン化:すぐに約50mlの変性液(0.2 N HCl)をピペットでゲル上に注ぎます。ブロモフェノールブルーが黄色になるまで(約20分間)放置、もしくは低エネルギーUV光(302 nm)を5分間照射します。その後、折りたたみ式スタンドを利用してブロッティングユニットをグローブした手で押さえながら傾けます。ゲル上に残っている溶液を丁寧にピペットもしくはアスピレーターで除いてください。

7. 転写:すぐに、1M NaOHをゲルの厚さの2倍の深さになるようブロッティングユニット内に注ぎます。DNAの大きさにより、転写時間は1～1.5時間で調整します。この間、ゲルが溶液中に浸っているように注意します。その後、転写溶液は上記方法で除いてください。

注意

ゲルの脇から溶液を注ぐと、メンブレンがもち上がり、ずれる可能性があるのでゲル上から静かに注ぐ。

8. ポンプのスイッチを切り、ウェルの印をつけます。ゲルを持ち上げ除いて、メンブランを取り出します。

9. メンブレンを2×SSC で10分間洗い、アガロースが残らないようにします。室温で30分間乾燥させます。

溶液組成

I. 脱プリン化溶液　0.2 N HCl
II. アルカリ溶液　1 M NaOH
III. 洗浄液　2 × SSC

4. RNAのバキュームトランスファー

イントロダクション

VacuGene XLブロッティングシステムは、低圧真空下でDNAおよびRNAをメンブランに転写します。以下の方法は、RNAの転写のために至適化した方法です。

アプリケーション

このプロトコールは、ホルマリンまたはグリオキサールバッファーでの電気泳動により分離された、RNAの転写について述べたものです。ここでは、20 × SSCバッファーの使用をすすめていますがリン酸バッファーでの転写も、良好な結果が得られています。

操作

1. トラップ用ボトルを間にして、ポンプとブロッティングユニットをチューブで接続します。サポートスクリーンを滑らかな面を上にしてユニットにセットします。

2. サンプルウェルより上を切り離したゲルサイズよりも、各辺が3 ～ 5mm大きくなるようナイロンメンブレンを切り、前処理し、ゲルサイズより各辺が2 ～ 3 mm小さい窓をプラスチックマスクにあけます(ニトロセルロースメンブランはNaOH溶液に弱いのでご注意ください)。

3. サポートスクリーン上にメンブレンがマスクの窓枠部にくるよう、メンブレン、マスクの順におきます。トップフレームをのせ四隅をクランプで締めます。

4. ゲルを窓全体にオーバーラップするように置きます。21 × 31 cm以上のゲルは切ってのせます。

   a) ゲルは端からメンブランの上に載せていき、気泡が入らないようにします。ゲルとマスクの窓枠は少なくとも、2 mm重なるようにします。

   b) ゲルの中の小さな割れは溶かした低融点アガロースでシールしてください。

5. ポンプのスイッチを入れ真空圧が50 ～ 55 mbarになるように設定します。

注意

バキューム状態の時、ゲルは常に溶液で覆われていなければならないのでご注意ください。必要なら、さらに液を加えます。

6. ポンプ始動後すぐにゲル上に蒸留水をもりあげるようにのせ、ホルムアミドで洗浄を5分間行います。折りたたみ式スタンドを利用して、グローブをした手でゲルを押さえながらブロッティングユニットを傾けます。ユニット内に残っている溶液は丁寧にピペットまたはアスピレーターで除去してください。

7. RNA転写の効率を上げるために、アルカリ加水分解による部分的加水分解を行います。アルカリ溶液をゲルの上にもりあげるようにのせます。5分間放置。余分な液は、上記方法により除去してください。

8. 中和液をゲルの上にのせ、5分間放置します。余分な液は、上記方法により除去します。

9. 転写液IV（またはV）をゲルの厚さの2倍の深さになるように、ゲルの上からユニットに注ぎ約30分間転写します（ブロッティングユニット内は、溶液で満たされる）。

注意

ゲルの脇から液を注ぐと、ゲルがメンブレンからずれる可能性があるのでご注意ください。

備考

転写時間は、RNAのタイプにより、長くする必要があるかもしれません。転写中、ゲルが溶液に浸っているようにします。余分な溶液は、ピペットまたはアスピレーターで除去してください。

10. ポンプのスイッチを切りウェルの印をつけます。ゲルを端から持ち上げて取り出し、メンブランを取り出します。

11. メンブランを転写液で洗浄します。（最大5分間）

注意

長すぎる洗浄は転写されたRNAをはずしてしまう恐れがあります。

12. 室温で30分間乾燥させます。1 ～ 2時間加熱するか、UVで処理して固定します。グリオキシル化されたRNAの場合には、6 ～ 8のステップは必要ありません。

溶液組成

I.	蒸留水	50 mM NaOH, 10 mM NaCl
II.	アルカリ溶液	0.1 M Tris-Cl pH 7.4
III.	中和液	20 × SSC :175.3 g NaCl
IV.	転写液	88.2 g Na-Citrate in 800 ml. Adjust pH to 7.0 and volume to 1 liter
V.	転写液	Phosphate buffer : Mix 685 ml 0.1 M NaH_2P0_4 with 315 ml 0.1 M Na_2HP0_4 and adjust pH to 6.5

©2005 GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本書の全部または一部を無断で複写複製することは著作権上での例外を除き禁じられています。

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本 社 〒169-0073
東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルヂング

お問合せ：バイオダイレクトライン
TEL : 03-5331-9336　FAX : 03-5331-9370
e-mail : Tech-JP@ge.com

Home Page **http://www.gehealthcare.co.jp/lifesciences**

ISO 9001:2000認証取得

GE Healthcare

安全上のご注意

必ずお守りください

このしおりには、弊社機器に関する一般的な注意事項を記載しています。取扱いの詳細は必ず製品添付の使用説明書をご覧ください。

誤った取扱いをした場合に生じる危険や損害の程度を、次の区分で説明しています。

警告 誤った取扱いをした場合に、死亡や重傷を負う可能性があるもの。

注意 誤った取扱いをした場合に、傷害または物的損害が発生する可能性があるもの。

図記号の意味は次の通りです。

禁 止 ⃠は、してはいけない「禁止」を示します。

❗は、必ず実行していただく「強制」を示します。

警告

禁 止

電源プラグの抜き差しにより、運転を停止しない

火災・感電の原因になります。

禁 止

電源コードを途中で接続しない、タコ足配線をしない

火災・感電・故障の原因になります。

禁 止

電源コード・電源プラグを傷つけない

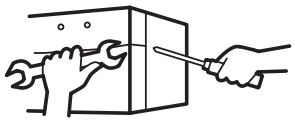
●加工しない ●束ねない ●ねじらない
●折らない ●物をのせない ●加熱しない
●無理に曲げない

破損して火災・感電の原因になります。

禁 止

修理・分解・改造はしない

火災・感電の原因になります。



根元まで差込む

電源プラグのほこりを取り除き、刃の根元まで確実に差込む

接続が不十分だと、隙間にほこりが付着して火災・感電の原因になります。

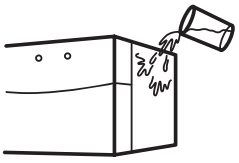
指定の規格

取扱説明書に指定された規格のコンセントを使用する

指定された規格以外で使用すると火災・感電の原因になります。

禁 止

本体を水につけたり、水をかけたりしない



ショート・感電の原因になります。

禁 止

電源コードや電源プラグが傷んだり、コンセントの差し込みがゆるいときは使わない

感電・ショート・発火の原因になります。

禁 止

使用時や使用直後（運転停止後約60分間）は、操作に関係のない部位には触れない

高温部に触れ、やけどの原因になります。

プラグを抜く

異常時は、運転を停止して電源プラグを抜く

異常のまま運転を続けると火災・感電の原因になります。

禁 止

同梱の電源コード・電源プラグ以外のコード・プラグを使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

禁 止

同梱の電源コード・電源プラグを他の電気機器に使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

⚠ 注意

禁 止

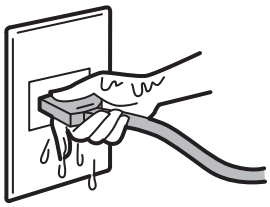
設置時は、次のような場所には置かない

●不安定な場所　●湿気やほこりの多い場所
●油煙や湯気が当たる場所
●直射日光の当たる場所　●風雨のあたる場所
●熱器具の近く　●高温になる場所
●吸・排気口をふさぐような場所

このような場所に置くと、ショートや発熱、電源コードの被膜が溶けるなどして、火災や感電、故障、変形の原因になることがあります。

禁 止

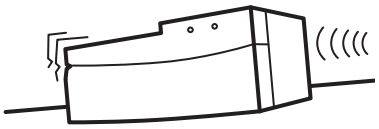
ぬれた手で電源プラグを抜き差ししない



感電の原因になります。

水平

水平で丈夫な場所に設置する



プラグを持つ

電源プラグを持ってまっすぐ引き抜く

ななめに引き抜いたり、コードを持って抜くと、プラグの刃や芯線が破損してショート・感電・発火の原因になります。

⚠ 低温室で使用する場合の注意

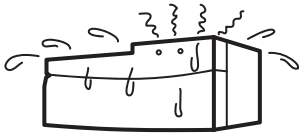
電源を入れておく

装置を低温環境下でご使用になる場合、システム電源は常時入れておく

低温環境下で長時間システムの電源を落とした状態で放置すると、結露などにより故障の原因になります。
ランプなどの消耗品は OFF にしておくと、劣化を防ぐことができます。

電源を入れない

装置を低温室から常温の場所に移動させる場合、常温に設置後、装置内の結露が無くなるまでシステム電源を入れない（状況により異なるが、通常半日から一昼夜）



感電・漏電火災の原因になります。

弊社製品についてのお問合せ　（バイオダイレクトライン）

TEL : 03-5331-9336

受付時間 9 : 00 ～ 17 : 30
土・日・祝日、弊社指定休業日、年末年始を除く